

BEST AVAILABLE COPY

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected Free

1. 1/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

015096404 **Image available**

WPI Acc No: 2003-156922/200315

XRAM Acc No: C03-040813

Liver generation promoter comprises adiponectin useful for treating and preventing liver cirrhosis and chronic hepatitis

Patent Assignee: MATSUZAWA Y (MATS-I); SANKYO CO LTD (SANY); ZH SENTAN

IRYO SHINKO ZAIDAN (SENT-N); FUNAHASHI T (FUNA-I); TAMURA S (TAMU-I)

Inventor: FUNAHASHI T; MATSUZAWA Y; TAMURA S

Number of Countries: 101 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 2002100427	A1	20021219	WO 2002JP5574	A	20020605	200315 B
JP 2002363094	A	20021218	JP 2001172882	A	20010607	200315
EP 1393739	A1	20040303	EP 2002733330	A	20020605	200417
			WO 2002JP5574	A	20020605	
AU 2002306266	A1	20021223	AU 2002306266	A	20020605	200452
US 20040180818	A1	20040916	WO 2002JP5574	A	20020605	200461
			US 2003479581	A	20031203	

Priority Applications (No Type Date): JP 2001172882 A 20010607

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 2002100427 A1 J 19 A61K-038/17

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW

JP 2002363094 A 5 A61K-038/00

EP 1393739 A1 E A61K-038/17 Based on patent WO 2002100427

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI TR

AU 2002306266 A1 A61K-038/17 Based on patent WO 2002100427

US 20040180818 A1 A61K-038/17

Abstract (Basic): WO 2002100427 A1

NOVELTY - Liver generation promoter comprises adiponectin.

ACTIVITY - Hepatotrophic; Antiinflammatory.

MECHANISM OF ACTION - TGF-Antagonist-Beta; PDGF-Antagonist.

In 6 day assays using rat hepatic stellate cells in the presence of 10 ng/ml PDGF adiponectin at 30 micro g/ml reduced cell death to less than 150 % compared to greater than 250 % for a control and 100 % in the absence of PDGF.

USE - As an inhibitor of the activity of transforming growth factor-beta and platelet derived growth factor on hepatic stellate cells and as a promoter of hepatocyte proliferation useful for treating and preventing liver cirrhosis and chronic hepatitis.

pp: 19 DwgNo 1/6

Title Terms: LIVER; GENERATE; PROMOTE; COMPRISE; USEFUL; TREAT; PREVENT;

LIVER; CIRRHOSIS; CHRONIC; HEPATO

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): A61K-038/00; A61K-038/17

International Patent Class (Additional): A61K-045/00; A61P-001/16;
A61P-043/00
File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2006 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	<input type="checkbox"/> Print/Save Selected	<input type="checkbox"/> Send Results	<input type="checkbox"/> Display Selected	Format Free
--	---	--	---------------------------------------	---	----------------

© 2006 Dialog, a Thomson business

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-363094

(P2002-363094A)

(43) 公開日 平成14年12月18日 (2002. 12. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード* (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/16		A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2001-172882 (P2001-172882)

(22) 出願日 平成13年6月7日 (2001. 6. 7)

(71) 出願人 599101070

松澤 佑次

兵庫県宝塚市雲雀丘山手 2 丁目 21-23

(71) 出願人 300061835

財団法人先端医療振興財団

兵庫県神戸市中央区港島中町 6 丁目 1 番地

神戸商工会議所会館 7 階

(72) 発明者 松澤 佑次

兵庫県宝塚市雲雀丘山手 2-21-23

(72) 発明者 船橋 徹

大阪府吹田市高野台 2-7-9

(74) 代理人 100071973

弁理士 谷 良隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝線維化抑制剤

(57) 【要約】

【課題】慢性肝疾患においては継続的な肝細胞壊死の後の細胞再生過程において線維化が起こり、正常な肝の再生が妨げられている。肝線維化に関する細胞外マトリックス産生は、主に TGF β 、PDGF などにより活性化された肝星細胞によって行われる。この TGF β や PDGF の肝星細胞への働きかけを阻止できれば、肝線維化は抑制されと考えられる。

【解決手段】脂肪組織特異的なタンパク質であるアディポネクチンは、これまで血管平滑筋の増殖、遊走抑制作用、抗動脈硬化作用、単球やマクロファージの活性化抑制作用、抗炎症作用などが知られていたが、肝星細胞への働きかけについては全く知られてなかった。本発明により、アディポネクチンが肝線維化抑制、正常肝細胞増殖促進効果のあることが確かめられた。

【特許請求の範囲】

【請求項1】アディポネクチンを含有してなる肝線維化抑制剤。

【請求項2】肝硬変予防・治療剤である請求項1記載の肝線維化抑制剤。

【請求項3】慢性肝炎予防・治療剤である請求項1記載の肝線維化抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はアディポネクチンを含有してなる肝線維化抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】肝臓は再生力の非常に強い臓器として知られている。しかし、慢性肝疾患においては持続的な肝細胞壊死後の再生過程において線維化が起こり、正常な肝細胞の再生を妨げている。その理由として、肝線維化に関わる細胞外マトリックス増加による類洞内血流の低下や、線維により肝再生の場がなくなることなどがあげられている。肝線維化に関わる細胞外マトリックス産生は主に活性化肝星細胞HSC (Hepatic Stellate Cell)で行われている。HSCはTGF(Transforming Growth Factor)- β 、PDGF(Platelet Derived Growth Factor)などのサイトカインや酸化ストレスなどにより活性化されると、 α -平滑筋アクチン(α SMA)を発現し筋細胞としての性格も獲得して筋線維芽様細胞へと形質変換する。更に活性化したHSCではTGF β の受容体の発現が亢進し、オートクリン機序により細胞外マトリックス蛋白の産生が亢進する。また、TGF β は肝細胞の増殖抑制作用をも持ち合わせている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者らは何らかの方法でTGF β およびPDGFのHSCに対する働きを阻害することができれば、肝線維化を抑制し、肝障害後の肝再生を正常に導くことができると考えた。本発明は、肝線維化を抑制し、線維化された肝臓を正常化する医薬を提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】アディポネクチンは、1996年、前田らによりヒト脂肪組織から新たに分離された動物脂肪組織特異的タンパク質であり、そのアミノ酸配列も明らかにされている。(Maeda K, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 221:286(1996))。これとほぼ同時期に他の研究グループにより、マウス3T3-F442A細胞からクローニングされたACRP30と呼ばれる物質(Scherer PE et al. J. Biol. Chem. 270:26746~26749(1995))はアディポネクチンと同一物質と考えられている。このアディポネクチンは、脂肪組織のみならず、血中にも多量存在しており、正常ヒト血中には5~10 μ g/mlという高濃度で存在している

(Arita Y et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2

57:79~83(1999))。また、このアディポネクチンは肥満が進むにつれてパラドキシカルに血中濃度が低下する。

【0005】このアディポネクチンの作用については、これまでにいくつかの研究グループにより血管平滑筋の増殖ならびに細胞遊走の抑制、抗動脈硬化作用のあることや、単球、マクロファージの活性化抑制、抗炎症作用などが判明しているが、その作用の全容については未だ明らかではない。本発明者は、このアディポネクチンの作用について、種々検討を重ねるうち、これまで知られていなかった肝星細胞の活性化の抑制、細胞外マトリックス産生の抑制、肝星細胞増殖の抑制、肝細胞増殖促進などの作用を有していることを知った。これらの新知見を基に更に研究を重ね、本発明を完成するに至った。

【0006】即ち、本発明は、(1)アディポネクチンを含有して成る肝線維化抑制剤、(2)肝硬変予防・治療剤である(1)記載の肝線維化抑制剤、および(3)慢性肝炎予防・治療剤である(1)記載の肝線維化抑制剤、である。

【0007】

【発明の実施の形態】既に述べたように、アディポネクチンはヒトを含む動物の脂肪組織で産生され、血中にも多量存在するタンパク質である。ヒト・アディポネクチンについては、これをコードするcDNAから遺伝子組換え法により高純度に精製されたものが得られている。

(Arita, Y. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 257, 79~83(1999))。マウス由来のACRP30も、前述のとおり組み換え遺伝子の手技により高純度のものが得られており、市場で入手可能である。本発明の肝線維化抑制剤を投与する対象の患者は、慢性肝臓疾患、特に慢性肝炎などにより、肝臓に線維化が起こっている患者あるいはその危険性のある患者である。そして、これらの患者に対して本発明の肝線維化抑制剤を投与することにより、肝線維化を阻止又は予防することができ、正常肝細胞の再生が促進される。

【0008】本発明の肝線維化抑制剤は、全身的または局所的に投与することができる。全身的としては静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射などの非経口法その他、経口投与等が挙げられ、いわゆる遺伝子治療も可能である。本発明の医薬の製剤形態としては、注射剤などの液剤、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、坐剤などの固形剤などが挙げられる。ヒトに非経口的に投与するために製造される組成物としては、注射剤、坐剤などが挙げられる。組成物が注射剤として製造される場合、たとえば溶剤

(注射用蒸留水など)、安定化剤(エデト酸ナトリウムなど)、等張化剤(塩化ナトリウム、グリセリン、マンニトールなど)、pH調整剤(塩酸、クエン酸、水酸化ナトリウムなど)、懸濁化剤(メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなど)を用いることができ、坐剤として製造される場合、たとえば坐剤基

剤（カカオ脂、マクロゴールなど）などを適宜に選択して使用することができる。

【0009】ヒトに経口的に投与される組成物としては、たとえば粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、シロップ剤および液剤などが挙げられる。組成物が粉末、顆粒、錠剤などとして製造される場合、固形組成物を製造するのに好適な任意の製薬担体、たとえば賦形剤（デンプン、トウモロコシデンプン、ブドウ糖、果糖、白糖など）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウムなど）、崩壊剤（デンプン、結晶セルロースなど）、結合剤（デンプン、アラビアゴムなど）などを用いることができ、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウなど）、腸溶性コーティング剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロースなど）などで剤皮を施してもよい。さらに、持続性製剤（DDS製剤）ためのコーティング剤として、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレンリコール、ツイーン80、プルロニックF68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネート、オイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合）などが用いられる。カプセル剤とする場合には、適当な賦形剤、例えば流動性と滑沢性を向上させるためのステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、軽質無水ケイ酸など、また加圧流動性のための結晶セルロースや乳糖などの他、上記崩壊剤などを適宜添加したものを均等に混和または、粒状、若しくは粒状としたものに適当なコーティング剤で剤皮を施したものを充填するか、適当なカプセル基剤（ゼラチンなど）にグリセリンまたはソルビトールなど加えて塑性を増したカプセル基剤で被包成形することもできる。これらカプセル剤には必要に応じて、着色剤、保存剤〔二酸化イオウ、パラベン類（パラオキシ安息香酸メチル、エチル、プロピルエステル）など〕などを加えることができる。カプセル剤は通常のカプセルの他、腸溶コーティングカプセル、胃内抵抗性カプセル、放出制御カプセルとすることもできる。腸溶性カプセルとする場合、腸溶性コーティング剤でコーティングしたリボソームを通常のカプセルに充填または、カプセル自身を腸溶性コーティング剤でコーティング、もしくは腸溶性高分子を基剤として成形することができる。また、組成物がシロップや液剤として製造される場合、たとえば安定剤（エデト酸ナトリウムなど）、懸濁化剤（アラビアゴム、カルメロースなど）、矯味剤（単シロップ、ブドウ糖など）、芳香剤などを適宜に選択して使用することができる。

【0010】投与量は、疾病の種類、患者の性別、年

齢、疾病の程度、投与形態、投与ルート等により異なってくるが、静脈注射の場合、肝硬変を患っている成人一人当たり、一日1~100mg/kg、好ましくは、3~20mg/kgである。

【0011】

【実施例】以下に試験例、実施例などを挙げて、本発明を更に具体的に説明する。

試験例1

1. 材料と方法

10 ラット肝星細胞（RHSC）の分離

8週令の雄のSD系ラットをネブタールで麻酔した後開腹し、門脈にカニューレションした。まず Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まないハanks（Hanks）液による灌流、つづいてコラゲナーゼ溶液による灌流によって肝を消化し、低速の遠心分離およびメッシュにて肝細胞を除いた非実質細胞浮遊液を得た。続いてエルトリエーションローター（3250回転/分、18ml/分）を用いて肝星細胞を分離した。得られた肝星細胞をプラスチックデッシュにまいた後、トリプシン/EDTA法で継代していき、3から5代継代培養したものを以下の実験に用いた。培地は、10%FCSを含むDMEM培地で、抗生剤として25mg/lのセファメジンと30mg/lのカナマイシンを用いた。

【0012】2. RHSCのDNA合成抑制作用
細胞の 3H -チミジンの取り込みにより評価した。即ち、96ウェルのβプレートに 9×10^3 個/ウェルずつ4代継代したRHSCをまき、翌日細胞が接着していることを確認後、PBSで2回洗い、無血清の培地に変えた。48時間後アディポネクチン（ACRP30）を0、3、10、30μg/mlの各濃度でPDGF10ng/mlを添加、無添加のメディウムで各々6ウェルずつ18時間刺激した。その後各ウェルに5時間1.0μCi/mlの 3H -チミジンを入れてパルスした後カウントした。結果は1ウェルの30秒あたりのカウントで表記した〔図1〕。〔図1〕から明らかなように、ACRP30は、PDGFによるDNA合成を濃度依存性に抑制した。

40 【0013】3. RHSC増殖抑制作用

12ウェルのβプレートに4代継代したRHSCを 2×10^4 個/ウェルずつまいた。翌日細胞が接着していることを確認後、2回PBSで洗浄し、無血清培地に変えた。48時間後コントロール（PDGF（-）、ACRP30（-））、PDGF10ng/ml添加でACRP30を0、10、30μg/mlの各濃度で添加し、各々3ウェルずつ刺激した。初日、2日目、4日目、6日目でトリプシン/EDTA法で細胞を剥がし、ヘモサイトメーターを用いて細胞数をカウントした。結果は0日目の細胞数の平均値を100%とし、パーセント表示した〔図2〕。〔図2〕から明らかなように、ACRP30は、濃度依存性にPDGFによるRHSC細胞数の

増殖を抑制した。

【0014】4. 肝星細胞遊走能抑制作用

遊走能は24ウェルβプレートと8μmポアサイズのセルカルチャーインサート(ケモタキセル、クラボウ)を用いて行った。ディッシュとセルカルチャーインサートは前もってコラーゲンIで1時間コートしておいた。2枚の10cmディッシュでサブコンフルエントなRHSCを2回PBSで洗った後、無血清培地に変え、48時間培養した。その後2回PBSで洗い、30分間ACRP30を30μg/ml入れたものと、入れないものでインキュベートし、トリプシン/EDTA法で細胞を剥がした。細胞は無血清のDMEM中に混ぜた。インサートを各種メディウムを入れた24ウェルβプレートに静かに置いた。メディウムは全て無血清でPDGF、ACRP30の入っていないもの、PDGF10ng/mlとACRP30を30μg/ml入れたもので各3つのインサートを準備した。各インサート中には4×10⁴個ずつRHSCを撒いた。その後37℃で5時間インキュベートし、インサートの裏側に出てきたRHSCをメイギムザ染色で染め、200倍の視野で測定し、細胞をカウントした。結果はコントロールの細胞数の平均値を100%とし、パーセント表示した〔図3〕。〔図3〕から明らかなように、ACRP30は、PDGFによる刺激のないコントロールと同程度までHSCの遊走を抑制した。

【0015】5. TGFβ刺激に対するACRP30の効果

6ウェルβプレートにRHSCを撒き、サブコンフルエントの状態に2回PBSで洗った後、無血清のDMEM*

実施例1

製剤例1 注射剤

アディポネクチン
リン酸緩衝液

これを2mLのガラスアンプルに分注し、密封する。

製剤例2 錠剤(腸溶錠)

アディポネクチン 0.8g
トウモロコシデンプン 12g
乳糖 27.2g
ステアリン酸マグネシウム 0.4g

アディポネクチン、乳糖およびトウモロコシデンプンを加えてよく混和し、湿性錠剤調製法に準じて打錠用顆粒とする。ステアリン酸マグネシウムを加えて打錠し、錠剤400錠とする。錠剤は、腸溶性コーティング剤(メタクリル酸コポリマー)でコーティングする。

【0018】

【発明の効果】本発明の肝線維化抑制剤は、活性化された肝星細胞による線維化を抑制するのみならず、正常肝細胞の再生増殖を促進させるので、慢性肝炎等により肝臓の線維化が起こっている患者又は線維化が予想される

*に変えた。48時間培養しコントロール(TGFβ、ACRP30ともなし)、TGFβ50pg/ml、TGFβ50pg/ml+ACRP3030μg/mlの各種メディウムで24時間培養した。その後トリゾール法により各ウェルのRHSCからRNAを抽出した。RNAは吸光度計にて濃度を測定し、各1μgずつをテンプレートにしてRTにてcDNAを作成した。そのうち0.5μlをテンプレートにしてPCRを行った。PCR産物は1.5%アガロースゲル上で電気泳動し、サイバーグリーンを用いて染めた。PCRはTGFβ、TGFβタイプIIレセプター、コラーゲンIα1の各プライマーでそれぞれ増幅がリニアになるサイクル数で行った(TGFβ25サイクル、TGFβタイプIIレセプター24サイクル、コラーゲンIα123サイクル)。泳動したゲルのバンドは蛍光イメージスキャナーにてコンピュータに取り込みImage Quantソフトウェアにより定量した。統計学分析はグループ間の比較にはKruskal-Wallisテストを用い、ペア間の比較にはScheffeテストを行った。統計学的優位差はP値が0.05未満とした。

【0016】〔図4〕から明らかな様に、ACRP30はTGFβのオートクリン機序によるTGFβmRNAの発現を顕著に抑制し得た。〔図5〕から明らかなようにTGFβタイプIIレセプターの発現も抑制した。このことからACRP30によりTGFβのシグナル抑制効果があることが証明された。また、〔図6〕に示されるように、TGFβによりその発現が増加するコラーゲンIα1遺伝子の発現もACRP30により抑制された。

【0017】

2mg
適量(pH7.0)
合計1ml

患者に投与することにより、その線維化を予防・治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ACRP30によるRHSCのDNA合成抑制作用を示す。

【図2】ACRP30によるRHSCの増殖抑制作用を示す。

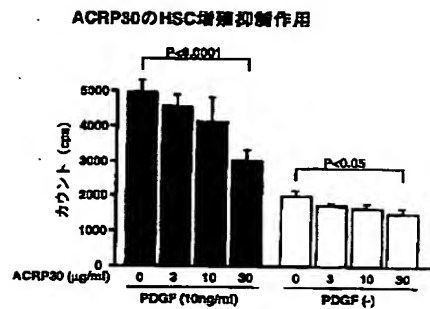
【図3】ACRP30によるRHSCの遊走抑制作用を示す。

【図4】ACRP30によるTGFβmRNA発現抑制作用を示す。

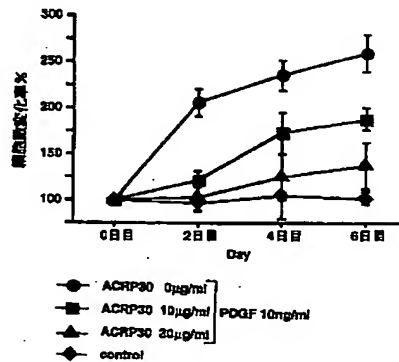
【図5】ACRP30によるTGFβタイプIIレセプター発現抑制作用を示す。

【図6】ACRP30によるコラーゲンIα1遺伝子発現抑制作用を示す。

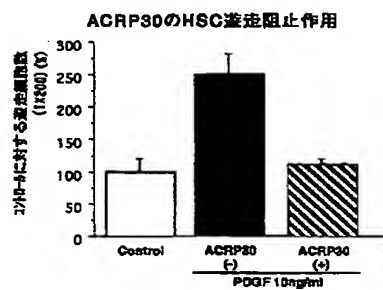
【図1】



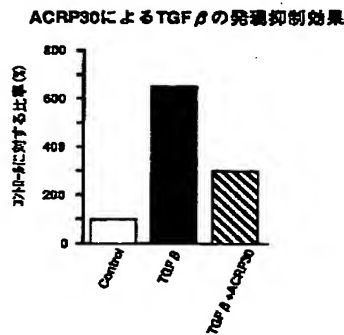
【図2】



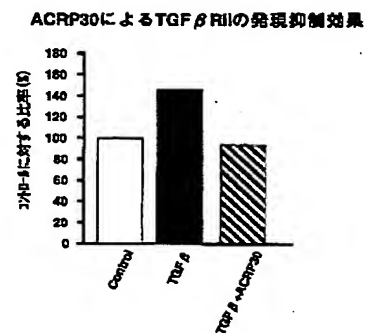
【図3】



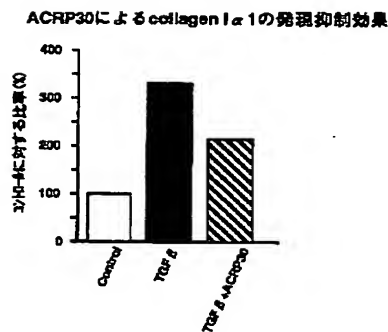
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 田村 信司
大阪府箕面市半町4-16-12

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 BA44 CA25 DC50
NA14 ZA752